

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. September 2005 (01.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/079985 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/00**,
C12M 1/34, G02B 21/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/011052

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Oktober 2004 (04.10.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 007 646.4
17. Februar 2004 (17.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **IBIDI GMBH** [DE/DE]; Gründerzentrum
Physik, Schellingstr. 4, 80799 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KAHL, Jo-
han-Valentin** [DE/DE]; Neustätterstr. 1, 80636 München
(DE). **ZANTL, Roman** [DE/DE]; Flurweg 5a, 85598
Baldham (DE).

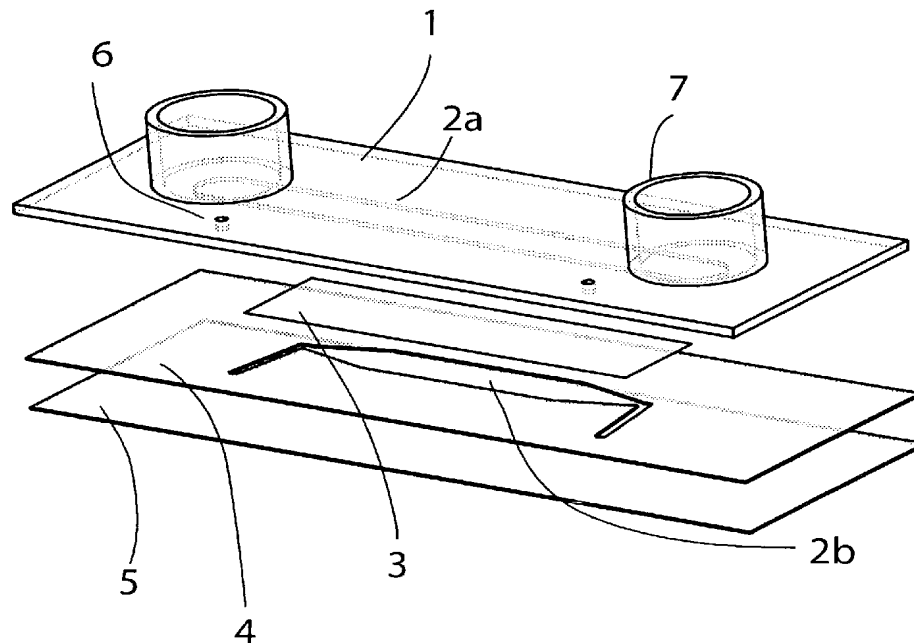
(74) Anwalt: **WEIGELT, Udo**; Grünecker, Kinkeldey, Stock-
mair & Schwanhäusser, Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR MICROFLUIDIC ANALYSES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG FÜR MIKROFLUIDUNTERSUCHUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to a device for microfluidic analyses for a substrate having a planar base surface and cover surface. A chamber (2) having at least two inlets is integrated inside the substrate in order to receive fluid and a semi-permeable or permeable membrane (3) is arranged in the chamber. The chamber is divided into two partial chambers (2a, 2b), which are provided with at least one respective inlet (6, 7), by means of the membrane.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/079985 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen für ein Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche, wobei in das Substrat eine Kammer (2) zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei Zuführungen integriert ist und in der Kammer eine halbdurchlässige oder durchlässige Membran (3) angeordnet ist, wobei die Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern (2a, 2b) mit jeweils wenigstens einer Zuführung (6, 7) unterteilt wird.

Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche, insbesondere zum Mikroskopieren von Zellen sowie zur Molekülanalyse.

10 Mikroskopische Untersuchungen von Zellen (Bakterien) oder Molekülen werden herkömmlicherweise auf Objektträgern, Deckgläsern, Petrischalen, Multititerplatten oder in Zellkulturflaschen durchgeführt. Aus dem Stand der Technik sind weiterhin Trägersysteme mit Flüssigkeitsaufnahmen wie Reservoirs oder Kanäle bekannt. Solche Trägersysteme sind beispielsweise in der DE 43 34 677 oder in der DE 201 16 019 offenbart. Dabei handelt es sich um zusammengeklebte Glassysteme oder Kunststoff-

15 kammern in Form eines Kanals, welche der optischen Mikroskopie zugänglich sind.

Diese Trägersysteme haben jedoch den Nachteil, dass nach Einfüllen einer Lösung mit den zu mikroskopierenden Partikeln, mit Ausnahme von Hinzufügen von Lösungen, keine Experimente, wie die Selektion bestimmter Partikel oder Migrationstudien,

20 mehr durchgeführt werden können. Solche Experimente müssen vor Befüllen des Trägersystems durchgeführt werden, was zum einen die gesamte Untersuchungsdauer verlängert und zum anderen die Gefahr eines Verunreinigens auf Grund des Umfüllens zur Folge hat.

25 Die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht daher darin, eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen bereitzustellen, mit der Partikelversuche, wie Selektion bestimmter Partikel oder Migrationsversuche, und ein anschließendes Mikroskopieren in einfacher und genauer Weise durchgeführt werden können.

30 Diese Aufgabe wird gelöst durch den Gegenstand von Anspruch 1. Erfindungsgemäß wird also eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche bereitgestellt, wobei in das Substrat eine Kammer zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei Zuführungen integriert ist und in der Kammer eine halb durchlässige oder durchlässige Membran angeordnet ist, wobei die

Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens einer Zuführung unterteilt wird.

Unter einer halbdurchlässigen Membran wird eine Membran verstanden, die nur von
5 einer Seite durchlässig und/oder teilchenselektiv durchlässig ist.

In die erfindungsgemäße Vorrichtung können zunächst Teilchen in Lösung gefüllt werden, dann Untersuchungen mit Hilfe der Membran (beispielsweise Filter-, Dialyse- und/oder Migrationsuntersuchungen) und anschließend direkt mikroskopische Analy-
10 sen durchgeführt werden.

Bei Filteruntersuchungen kann eine durchlässige oder poröse Membran vorgesehen sein, deren Pore oder Poren kleiner als die zu filternden Partikel (beispielsweise Bakterien) sind, so dass diese nicht durch die Membran gelassen werden. Für Dialyseun-
15 tersuchungen kann vorzugsweise eine halbdurchlässige (semipermeable) Membran vorgesehen sein, die beispielsweise für Zellen undurchlässig aber für Biomoleküle wie Proteine oder Salze durchlässig ist. Eine Teilkammer kann dann zur Kultivierung und Mikroskopie der Zellen bzw. Bakterien dienen. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Vorrichtung für Migrationstudien, insbesondere Chemotaxis-Untersuchungen, ver-
20 wendet werden, wobei zwischen horizontaler Chemotaxis (d. h., parallel zur durchlässigen Membran) und vertikaler Chemotaxis (d. h. senkrecht zur Membran) unterschieden wird.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung können die Teilkammern wenigstens teilweise parallel zueinander angeordnet sein. Dies kann durch eine geeignet ausgebildete
25 Kammer und/oder eine geeignet angeordnete Membran erreicht werden. Durch einen parallelen Verlauf der Teilkammern wird eine große Grenzfläche zwischen den Teilkammern erhalten, wodurch der Teilchenaustausch beschleunigt durchgeführt werden kann.

30

Vorzugsweise können die Teilkammern in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sein.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Membran wenigstens teilweise in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sein. Damit sind dann die resultierenden Teilkammern wenigstens teilweise in einer Ebene senkrecht oder parallel zur Grundfläche des Substrats angeordnet, wobei diese Anordnung insbesondere je nach gewünschter Anwendung gewählt werden kann. Eine Anordnung von Teilkammern übereinander (Membran parallel zur Grundfläche) kann vorteilhaft sein, wenn beispielsweise eine Gravitationswirkung auf die Teilchen in Richtung der Membran gewünscht ist. Bei einer Anordnung der Teilkammern nebeneinander (Membran senkrecht zur Grundfläche) sind insbesondere beide Teilkammern in gleicher Weise einfach mit dem Mikroskop zugänglich.

Vorteilhafterweise kann die Membran flexibel, vorzugsweise elastisch, sein. Bei einer flexiblen (biegsamen) Membran lässt sich die Form der Teilkammern verändern; eine elastische Membran erlaubt durch Beaufschlagen der Membran mit Druck ein reversibles Verändern des Volumens der Teilkammern.

In einer vorteilhaften Weiterbildung kann die erste der beiden Teilkammern ein Gitter umfassen. Dabei kann das Gitter als mechanische Referenz dazu dienen, die zu detektierenden Partikel in einer Fokus-Ebene zu halten.

Weiter kann die Membran bei einem Fluidstrom von der zweiten in die erste Teilkammer teilweise oder vollständig an das Gitter gedrückt werden. In einem Fluidstrom werden Partikel in einer Flüssigkeit oder einem Gas transportiert. Das Gitter dient zusätzlich dazu, dass die Membran in dem Fluidstrom plan bleibt, nicht verrutscht oder nicht reißt. Dabei ist es möglich, dass zwischen Gitter und Membran ein dünner Fluidfilm übrig bleibt, eventuell auch, wenn man nach dem Fluidstrom Luft nachpresst, so dass der Fluidfilm die Membran und das Gitter zusammenhält. Die Maschenweite des Gitters, bzw. der Durchmesser der Bohrungen wird bevorzugt so gewählt, dass die Membran beim Filtervorgang nicht tiefer als die Fokustiefe des Auslesegerätes in die Maschen bzw. Löcher hineingedrückt wird.

Die Oberfläche der als Filter funktionierenden Membran kann durchgehend glatt, zumindest teilweise gelöchert und/oder zumindest teilweise permeabel sein.

Weiter kann die Membran fest zwischen erster und zweiter Teilkammer vorgesehen sein.

5

Dies kann dadurch ermöglicht werden, dass die Membran unter Spannung eingeklebt wird. Allerdings kann dabei das Problem auftreten, dass bei Verwendung von stark aushärtenden Klebern die Filtermembran reißt. Insbesondere sobald die Membran mit Lösungsmitteln in Verbindung kommt, die sie selbst oder die umgebenden Strukturen quellen oder schrumpfen lassen. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, dass man zur festen, also verklebten, Halterung elastische Polymere mit geringen Shorehärten, z.B. unter 60, verwendet, wie z.B. Silikon. Dazu kann man vorzugsweise in eine Nut eine Wurst aus Silikon verlegen, auf die dann der Rand der Membran aufgepresst wird. Alternativ kann man auch weiche Polymerstrukturen verwenden, um die Membran so einzuklemmen, dass sie sich bei dem Einklemmvorgang zumindest teilweise strafft.

10

15

Außerdem kann die Gefahr des Einreißen der Membran reduziert werden, indem man auch in diesem Fall die Membran während des Filtervorgangs, wenn das Fluid von der zweiten Teilkammer zur ersten Teilkammer durch die Membran Richtung Gitter strömt, auf dem Gitter aufliegen lässt. Dabei hat das Gitter ohne Anlegen des Fluiddruckes einen kleinen definierten Abstand zur Membran.

20

Alternativ ist es möglich, die Membran lose zwischen erster und zweiter Teilkammer anzuordnen.

25

Dabei kann es vorteilhaft sein, ein Mittel vorzusehen, das die Membran so positioniert, dass sie teilweise oder vollständig in dem Fluidstrom liegt. Der Fluidstrom kann dabei nahezu senkrecht auf die Membran treffen, bevor diese an das Gitter gedrückt wird.

30

Das Mittel zum Positionieren der Membran soll sicherstellen, dass das Fluid, das aus der Zuführung der zweiten Teilkammer in die erste Teilkammer strömt, unter die Membran (d.h. von der Grundfläche der zweiten Teilkammer aus) gelangt und diese dadurch gegen das Gitter drückt.

Dies kann z.B. durch eine Nut gewährleistet werden, die sich zwischen der Zuführung der zweiten Teilkammer und dem Gitter befindet und in der die Ränder der Membran zumindest teilweise gelagert sind. Alternativ kann dies auch durch eine Kerbe, eine
5 Ausbuchtung o.ä. realisiert werden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausbildung kann die Membran so angeordnet sein, dass sie durch eine Kraft, z.B. bei einem Fluidstrom von der ersten in die zweite Teilkammer, teilweise oder vollständig gegen die Grundfläche des Substrats/der zweiten
10 Teilkammer gedrückt wird. Dabei kann die Grundfläche aus einer Folie, bevorzugt einer Kunststofffolie, bestehen.

Dies kann z.B. dann geschehen, wenn die Membran durch einen Fluidstrom aus der zweiten Kammer mit den zu detektierenden Partikeln an das Gitter gedrückt wird und
15 dann die filternde Membran durch einen kurzen Rückfluss (Flüssigkeitsstrom, kurzer Gasstoß o.ä.) aus der Zuführung der ersten Teilkammer durch das Gitter Richtung zweite Teilkammer an die Grundfläche der zweiten Teilkammer gedrückt wird. Zuerst beult sich die Membran mit dem Rückflussdruck Richtung Grundfläche, berührt gegebenenfalls diese teilweise (in der Membranmitte), da sie an ihren Rändern z.B. in der
20 Nut noch fest steckt. Bei weiterem Druck durch den Rückfluss lösen sich auch die Ränder aus der Nut, und die Membran legt sich vollständig (auch mit ihren Rändern) an die plane Grundfläche an. Generell kann auch hier ein dünner Fluidfilm zwischen Membran und Grundfläche übrig bleiben.

25 Alternativ können statt des strömenden Fluids auch magnetische Kräfte oder ein Stempel die Membran an die Grundfläche drücken.

Diese Vorrichtung hat den Vorteil, dass die von der Membran gefilterten Partikel zwischen Grundfläche (vorzugsweise eine Kunststofffolie) und Membran annähernd un-
30 beweglich eingeschlossen, also durch normale mechanische Beanspruchung nicht mehr zu entfernen sind. Weiter kann ein Auslesegerät die Grundfläche als Referenz, d.h. als Abstandhalter zur Membran, verwenden. Der voreingestellte Fokus würde sich in diesem Fall nur nach der Dicke der Grundfläche richten.

Üblicherweise können bei stark leuchtenden Partikeln (z.B. Fluoreszenz Beads) Objektive mit numerischen Aperturen von unter 0,5 verwendet werden bzw. optische Apparaturen mit ähnlichen Charakteristika. Damit liegt die Schärfentiefe im Bereich von ca. 10 – 200 μm . Bei schwach leuchtenden Partikeln werden typischerweise Objektive mit numerischen Aperturen bis 1,4 verwendet. Damit lassen sich Schichtdicken von bis zu 0,5 – 10 μm scharf abbilden. Damit ist zusätzlich die notwendige Glattheit der Membran definiert, da sämtliche zu detektierenden Objekte in diesem Fokusbereich liegen sollten.

- 10 In einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Membran wenigstens teilweise mit dem Boden der Kammer verbunden sein. Beispielsweise kann die Membran verklebt oder mittels Ultraschall-Bonden verbunden sein.

Weiter können Positioniereinrichtungen in dem Substrat vorgesehen sein, die die Membran beim Einbau fixieren sollen.

Vorzugsweise kann wenigstens ein Teil der Membran an einer Kammerwand, insbesondere dem Boden der Kammer, flächig anliegend lösbar angeordnet sein. Wenn die Membran an einer Kammerwand anliegt, ist sie durch diese Wand in einfacher Weise und direkt mikroskopisch zugänglich. Beispielsweise kann die Membran bei einer Untersuchung zunächst an einer Wand anliegen; dann wird eine Flüssigkeit mit zu untersuchenden Partikeln zwischen die Wand und die Membran gebracht, wodurch sich die Membran von der Wand löst. Ein Teil der Flüssigkeit und/oder der Partikel geht durch die Membran hindurch während ein anderer Teil an der Membran, beispielsweise in den Poren, hängen bleibt. Sobald der Druck durch die Flüssigkeit auf die Membran nachlässt, legt sich diese wieder, auf Grund ihrer Anordnung und/oder Elastizität, an die Wand der Kammer, so dass ihre Oberfläche mit den daran angeordneten Partikeln mikroskopisch untersucht werden kann.

- 30 Gemäß einer Weiterbildung der zuvor beschriebenen Vorrichtungen kann die Membran wenigstens eine Pore aufweisen, wobei jede Pore einen Porendurchmesser in einem vorbestimmten Teilbereich des Bereichs von 1 nm bis 20 μm , vorzugsweise 0,5 μm bis 20 μm , aufweisen kann. Der Teilbereich kann insbesondere auch den gesamten genannten Bereich oder nur einen bestimmten Wert aus dem Bereich umfassen.

Je nach Durchmesser oder Durchmesser-Verteilung der Poren kann die Teilchenselektivität der Membran und/oder der Fluss durch die Membran kontrolliert werden.

Die Poren können in einer besonderen Ausführung in einem regelmäßigen Abstand voneinander angeordnet sein. Der Porenabstand kann zwischen 5 μm und 2 cm betragen. Die Porenmuster können in einer bevorzugten Ausführung alle bekannten zweidimensionalen Kristallanordnungen darstellen. Die Anzahl der Poren in einem Untersuchungsreservoir können bis zu 50.000 betragen. Die Untersuchungsreservoirs können typischerweise eine Größe zwischen 5 μm^2 und 5 cm^2 aufweisen. In einer bevorzugten Ausführung sind zwischen einem und 8192 Reservoirs auf einem Träger untergebracht.

Dabei können die Poren ein regelmäßiges Muster bilden. In einem typischen Experiment werden chemotaktisch aktivierbare Zellen auf die Membran mit den regelmäßig angeordneten Poren gegeben und verteilen sich dort, solange keine Chemotaxine durch die Poren diffundieren und mit den Zellen in Kontakt kommen, gleichmäßig auf der Membranoberfläche.

Diffundieren Chemotaxine durch die Pore, beginnen die Zellen sich in Richtung der nächsten zu ihnen gelegenen Pore zu bewegen. Nach einer bestimmten Zeit, haben sich dann alle Zellen an den jeweiligen Poren gesammelt.

Den Unterschied zwischen der Gleichverteilung der Zellen vor Einwirkung der Chemotaxine und der Anlagerung der Zellen um die Poren nach Zugabe der Chemotaxine kann mittels Fourieanalyse quantifiziert werden. Die Gleichverteilung der Zellen erscheint im Fourierraum als Gerade. Die periodische Anordnung der Zellen um die Pore erscheint als 'deltaähnliche' Funktion am Wert im Fourierraum, der dem Porenabstand entspricht. Diese Methode ist besonders dann sinnvoll, wenn durch alle Poren das identische Chemotaxin mit der identischen Konzentration diffundiert. Insbesondere kann eine quantitative und zeitaufgelöste Aussage über die Zellbewegung getroffen werden, wenn der Übergang von der Geraden zu der Deltafunktion als Funktion der Zeit analysiert wird. Durch diese Methode ist ebenfalls eine einfache und schnelle Mittelung über das Verhalten vieler Zellen gegeben (Verbesserung der Statistik). In einer

Weiterbildung können die optisch sichtbaren Poren als Maßstab im Fourierraum verwendet werden.

5 In einer anderen Weiterbildung können durch die Poren verschiedene Chemotaxine diffundieren, so dass ein direkter Vergleich der Wirksamkeit dargestellt werden kann. Auch können identische Chemotaxine in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet werden, um eine genauere Analyse der Wanderungsgeschwindigkeit nachzuweisen.

10 In einer anderen Weiterbildung können verschiedene Porenarrays in verschiedenen Reservoirien untergebracht werden.

Wenn die Reservoirs als Kanal ausgebildet sind, kann die Flüssigkeit in diesem Kanal eingespannt werden. Durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit bewegt sich
15 dann die Flüssigkeit nicht aus dem Kanal heraus, auch wenn der Kanal geschwenkt wird. Dazu füllt die Flüssigkeit den Kanal vollständig bis zur den jeweiligen Ausgangsöffnungen. Der Kanal hat typischerweise eine Höhe zwischen 10 µm und 1 cm und eine Breite zwischen 10 µm und 5 cm. Die Länge kann zwischen 100 µm und 30 cm betragen.

20

In einer Weiterentwicklung können die Porenmuster alle bekannten zweidimensionalen Kristallanordnungen darstellen. Die Anzahl der Poren in einem Untersuchungsreservoir können liegt zwischen mindestens zwei und kann bis zu 50.000 betragen. Die Untersuchungsreservoirs können typischerweise eine Größe zwischen 5 µm² und 5 cm²
25 aufweisen. In einer bevorzugten Ausführung sind zwischen einem und 8192 Reservoirs auf einem Träger untergebracht.

Die Poren können auch unregelmäßige Muster bilden. Zur Analyse der Zellverteilung als Funktion der Zeit und somit der Zellbewegung kann die Korrelationsfunktion zwischen dem Bild der Löcher und dem Bild der 'chemotaxierten' Zellen verwendet werden.
30 Die Löcher können z.B. durch Neutronenbeschuss und anschließendes Ätzen erzeugt werden.

Die Membran der zuvor genannten Vorrichtungen kann vorzugsweise ein optisch hochwertiges Material umfassen. Mit einem optisch hochwertigen Material (d. h. ohne Doppelbrechung oder Autofluoreszenz oder mit einer Autofluoreszenz oder Doppelbrechung, die gleich oder geringer als die von COC oder COP ist) lassen sich in verbesserter Weise optische Untersuchungen, insbesondere auf beiden Seiten der Membran durchführen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Kammer wenigstens vier Zuführungen umfassen und durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens zwei Zuführungen unterteilt werden. Damit ist jede Teilkammer unabhängig von der anderen fluidisch adressierbar, d. h. jede der Kammern weist eine eigene Zufluss- und Abflussöffnung auf.

Weiter kann wenigstens eine der Zuführungen ringförmig um die Kammer verlaufen, um ein gleichmäßiges Befüllen der Kammer zu gewährleisten.

Vorteilhafterweise kann die Membran und/oder eine Kammerwand eine Oberflächenfunktionalisierung aufweisen. Damit können in einzelnen Bereichen bestimmte Vorgänge, wie Zellwachstum oder Adhäsion von Partikeln, begünstigt werden. Unterschiedliche Bereiche der Membran oder der Kammerwand können unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen aufweisen.

Vorzugsweise kann die Oberflächenfunktionalisierung eine Beschichtung, insbesondere mit wenigstens einem Polyelektrolytenfilm, einem Adhäsionsfaktor, einer funktionellen Gruppe, einer Lipidmembran, einem Zellrasen und/oder einem Blockingmolekül, umfassen.

Die Polyelektrolytfilme können PAA (Polyacrylsäure), PEI (Polyethylendiimid) und/oder PSS (Polystyrolsulfonsäure) umfassen; die Biomoleküle können Proteine oder DNA und die Adhäsionsfaktoren können RGD-Peptide umfassen. Die funktionelle Gruppe kann COOH oder NH₂ und das Blockingmolekül kann BSA, Gelatine oder DNA umfassen.

Vorzugsweise kann das Substrat der zuvor beschriebenen Vorrichtungen einen Kunststoff, insbesondere einen optisch hochwertigen und/oder einen optisch nicht transparenten Kunststoff, umfassen. Ein optisch hochwertiger (d. h. ohne Doppelbrechung oder Autofluoreszenz) Kunststoff reduziert störende Einflüsse des Substrats
5 beispielsweise bei Fluoreszenz-Untersuchungen; durch die Verwendung eines optisch nicht transparenten Materials können Störungen auf Grund von außen einfallendem, unerwünschtem Licht vermieden werden.

Vorzugsweise kann das Substrat ein Deckenelement umfassen, in dessen Grundfläche eine Ausnehmung für die Kammer vorgesehen ist. Insbesondere kann die Ausnehmung in Form eines Grabens ausgebildet sein. Dies ermöglicht eine einfache Herstellung des Substrats.
10

Das Deckenelement kann eine Deckplatte sein. Das Deckenelement ist in diesem Fall
15 ein Stück und lässt sich einfach herstellen.

Alternativ kann das Deckenelement eine Zwischenplatte, in welcher ein Durchbruch für die Kammer vorgesehen ist, und eine Abdeckplatte, welche zum Abdecken des Durchbruchs auf einer Seite der Zwischenplatte vorgesehen ist, umfassen. In diesem
20 Fall umfasst also das Deckenelement zwei Platten, nämlich eine Zwischenplatte und eine Abdeckplatte. Dabei kann die Abdeckplatte auf der der Zwischenplatte zugewandten Seite eine Aufnahme aufweisen. Damit wird dann die Form der Kammer durch die Ausnehmung in der Abdeckplatte und die Form des Durchbruchs bestimmt. Alternativ kann die Abdeckplatte keine Ausnehmung aufweisen, so dass die gesamte
25 Ausnehmung des Deckenelements durch den Durchbruch bestimmt wird.

Die Zwischenplatte kann eine Kunststofffolie, insbesondere mit einer Dicke von $1\mu\text{m}$ – 1mm, sein.

Vorzugsweise kann die Membran zwischen der Abdeckplatte und der Zwischenplatte angeordnet sein. Auf diese Weise lässt sich die Membran insbesondere einfach mit dem Substrat verbinden, indem sie beispielsweise zwischen die Abdeckplatte und die Zwischenplatte geklemmt wird und/oder mit wenigstens einer dieser beiden (Teil-) Platten durch Kleben, Ultraschallbonden oder Ähnlichem verbunden wird. Wenn die
30

Abdeckplatte selbst noch eine Aufnahme aufweist, wird somit eine Teilkammer durch die Aufnahme in der Abdeckplatte gebildet und von der anderen Teilkammer, die durch den Durchbruch in der Zwischenplatte gebildet wird, mittels der Membran (Zwischenwand) getrennt.

5

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann das Substrat ein Abdeckelement zum Abdecken der Ausnehmung umfassen. Dieses bildet die verbleibende Wand der Kammer, die durch die Ausnehmung, ob mit oder ohne Zwischenplatte, gebildet wird.

- 10 Vorteilhafterweise kann das Abdeckelement eine Kunststoffolie, insbesondere aus einem optisch hochwertigen Kunststoff und/oder mit einer Dicke von 50 µm bis 1 mm, sein. Zum einen lässt sich eine Kunststoffolie einfach mit dem Deckenelement verbinden und zum anderen lassen sich durch Verwendung einer Folie sehr geringe Dicken des Abdeckelements erzielen, was die Qualität von Mikroskopanalysen verbessert.

15

Vorzugsweise können die Zuführungen in die Deckfläche des Deckenelements des Substrats münden. Damit ist die Kammer bzw. sind die Teilkammern bezüglich der Flüssigkeitszugabe jeweils von oben zugänglich.

20

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann weiterhin wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir vorgesehen sein, welches auf dem Deckenelement des Substrats angeordnet ist und in welches eine Zuführung mündet. Ein solches Flüssigkeitsreservoir kann dazu dienen, größere Flüssigkeitsmengen an die Kammer abzugeben oder kann als

25 Überlaufbecken fungieren, wenn es an der Mündung der Abflusszuführung angeordnet ist.

25

Vorzugsweise kann das wenigstens eine Flüssigkeitsreservoir aus einem Kunststoff, vorzugsweise dem selben Kunststoff wie das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung, sein. Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung können das Flüssigkeitsreservoir und das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung als ein Stück ausgebildet sein. Dies bedeutet, dass das Reservoir nicht mit dem Deckenelement beispielsweise verklebt oder verschraubt ist. Auf diese Weise lassen sich Dich-

30

tungen zwischen dem Reservoir und dem Deckenelement vermeiden und die Gefahr von Kontamination wird verringert.

Vorzugsweise kann das eine Stück ein Spritzgussteil sein. Dies erlaubt eine einfache
5 Herstellung des Substrats.

Vorzugsweise kann das Substrat in einem Objektträger- oder Multititerformat ausgebildet sein.

10 Alle zuvor beschriebenen Vorrichtungen können dahingehend weiter gebildet werden, dass die Grund- und/oder Deckelfläche und/oder Membran aus einem optisch hochwertigen Material besteht, welches eine so geringe oder eine geringere Autofluoreszenz aufweist als COC (cyclische Olefin Copolymere) oder COP (cyclische Olefin Polymere).

15 Vorzugsweise können die Deckfläche und/oder Grundfläche auch aus jeweils einer Kunststoffolie bestehen.

20 Dabei kann die Grund- oder Deckelfläche auch aus einem optisch hochwertigen Material bestehen. Optisch hochwertig heißt, dass die Grundfläche optisch transparent ist oder eine Autofluoreszenz gleich oder geringer als die von COC oder COP aufweist oder keine Doppelbrechung hat oder im UV Licht transparent ist.

25 Um die Autofluoreszenz zu bestimmen, wurde mit dem Axivert S 100 von Zeiss, der HBO 50 Lampe und dem 40 X Plan Neofluar Objektiv von Zeiss (NA 0,75), sowie dem Filtersatz 09 von Zeiss (Anregung 450-490 nm, Emission 515-565 nm) in einem abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur gemessen. Alle relevanten Einstellungen, insbesondere die Einstellungen an der HBO Lampe, sowie die Stellung der Leuchtfeldblende, wurden während der Messung nicht verändert.

30 Der Meßbereich betrug 219 x 173 µm. Mit der Software IPLab (Scanalytics) wurde bei einem 2x2 Binning 500ms belichtet und ein Offset von 200 bei der 5 MHz MicroMax Kamera von Princeton Instruments (Austin/Texas) eingestellt.

Es wurden Materialien mit einer Dicke zwischen 150 μm und 200 μm verwendet und in die Mitte des Präparates fokussiert.

Bei dieser Einstellung wurde bei Glas (Menzel-Gläser 25 x 75 mm) mit einer Dicke
5 von 170 $\mu\text{m} \pm 5\mu\text{m}$ ein mittlerer Pixelwert von 64 ± 3 bestimmt.

Die Foliendicke bei dem verwendeten COC betrug 190 $\mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$, und es wurde ein mittlerer Pixelwert von 97 ± 5 bestimmt. Bei dem verwendeten COP betrug die Foliendicke ebenfalls 190 $\pm 5\mu\text{m}$, und es wurde ein mittlerer Pixelwert von 107 ± 6 bestimmt.
10 Unter diesen Bedingungen, insbesondere bei den verwendeten Filtern, sind alle Werte mit einer Autofluoreszenz kleiner als 120 als ‚geringe Autofluoreszenz‘ zu bewerten.

Bei der Verwendung von Filtersätzen ab einer Anregungswellenlänge von 529 nm wurden mit diesem Aufbau keine signifikanten Unterschiede zwischen Glas, COC und
15 COP bestimmt.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden nachfolgend anhand der Beispiele und Figuren beschrieben:

20 Figur 1 zeigt eine Explosionsansicht einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit einer Deckplatte und einer Zwischenplatte;

Figur 2a, 2b illustriert ein Beispiel einer Vorrichtung für Chemotaxis;

25

Figur 3a zeigt eine Explosionsansicht einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einer Deckplatte und einer am Boden der Kammer flächig anliegend lösbaren geordneten Membran;

30 Figur 3b zeigt eine Querschnittsansicht der Vorrichtung aus Figur 3a;

Figur 3c illustriert ein Verfahren mit der Vorrichtung nach den Figuren 3a und 3b;

Figur 4a-d zeigt eine Explosionsansicht einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Gitter und den Einbau der Membran;

Figur 5a zeigt eine Seitenansicht der Vorrichtung in Figur 4;

Figur 5b illustriert in einer Seitenansicht der Vorrichtung in Figur 4 den Fluidstrom aus der zweiten Teilkammer in Richtung der ersten Teilkammer;

Figur 5c zeigt in einer Seitenansicht der Vorrichtung in Figur 4 den Rückfluss eines Fluids aus der ersten Teilkammer in Richtung der zweiten Teilkammer;

Figur 5d zeigt in einer Seitenansicht der Vorrichtung in Figur 4 die Membran nach dem Rückfluss plan an der Grundfläche der zweiten Teilkammer anliegend.

In Figur 1 ist eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen in einer Explosionsansicht gezeigt. Die Vorrichtung umfasst ein Substrat, welches wiederum ein Deckenelement mit einer Abdeckplatte 1 und einer Zwischenplatte 4 umfasst. In der Grundfläche der Abdeckplatte ist eine Ausnehmung 2a vorgesehen, deren Zuführungen (nicht gezeigt) jeweils in ein Flüssigkeitsreservoir 7 münden. Die Zwischenplatte 4 weist einen Durchbruch 2b auf. Dieser Durchbruch ist so ausgebildet, dass er einerseits unter der Ausnehmung 2a der Abdeckplatte liegt und andererseits Zuführungen aufweist, die bei den Öffnungen 6 in die Deckfläche des Abdeckelements 1 münden.

Weiterhin umfasst das Substrat ein Abdeckelement 5, welches insbesondere als Folie ausgebildet sein kann. Auch die Zwischenplatte 4 kann als Kunststofffolie ausgebildet sein. In Figur 1 ist eine Membran 3 zwischen der Abdeckplatte 1 und der Zwischenplatte 4 angeordnet, so dass nach Zusammenfügen und Verbinden der Abdeckplatte 1, der Zwischenplatte 4 und des Abdeckelements 5 zwei Teilkammern entstehen, welche durch die Membran 3 getrennt werden. Die beiden Teilkammern werden dabei jeweils durch die Ausnehmung 2a bzw. den Durchbruch 2b und die dazwischen angeordnete Membran 3 gebildet, so dass im Folgenden auch die Teilkammern mit 2a bzw. 2b bezeichnet werden.

Die Membran kann dabei einfach zwischen die Abdeckplatte 1 und die Zwischenplatte 4 geklemmt sein oder mit einer dieser oder beiden Platten verbunden sein, beispielsweise durch Kleben oder Ultraschallbonden.

5

Es können beispielsweise z.B. Cyclopor Track Etched Membranen von Whatman oder Filtermembranen von Millipore verwendet werden.

10

Die resultierende Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen weist also eine Kammer auf, gebildet durch die Ausnehmungen 2a und dem Durchbruch 2b, die durch die Membran 3 in zwei Teilkammern in Form von Kanälen unterteilt wird. Jede der beiden Teilkammern weist eigene Zufluss- und Abflusszuführungen auf.

15

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und insbesondere die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung können insbesondere für Dialyseexperimente verwendet werden. Im Falle der in Figur 1 gezeigten Vorrichtung wäre die Teilkammer 2a der Dialysekanal und die Teilkammer 2b der Beobachtungskanal, die durch eine semipermeable Membran 3 voneinander getrennt sind. Der untere Beobachtungskanal 2b kann beispielsweise mit Suspensionskultur über eine der Öffnungen 6 und der obere Kanal 2a über die Reservoir 7 befüllt werden. Die Membran ist dann so gewählt, dass sie für Zellen undurchlässig aber für Biomoleküle wie z. B. Proteine und Salze durchlässig ist.

20

25

Durch die gezeigte Anordnung kann der Austausch durch die semipermeable Membran durch Diffusion oder Konvektion dominiert sein. Je größer die Kontaktfläche zwischen den beiden Teilkammern ist, desto schneller findet der Austausch statt.

30

Alternativ zu der gezeigten Ausführungsform, bei der die beiden Teilkammern parallel zueinander verlaufen und in einer Ebene senkrecht zur Grundfläche liegen, können die Teilkammern auch nebeneinander in einer Ebene parallel zur Grundfläche angeordnet sein.

In einer möglichen Anwendung werden adhärente Zellen in Kontakt mit einer Oberfläche (Wand) gebracht, an die Zellen durch spezifische Wechselwirkung an bestimmten Bindungsstellen adhärieren. Durch die Dialysemembran 3 wird eine Lösung gespült,

die eine vorbestimmte Konzentration von Antikörpern hat. Die Antikörper sind so gewählt, dass sie spezifisch an die Bindungsstellen der Zellen binden. Die Antikörper konkurrieren mit den extrazellulären Bindungsmolekülen der Zellen um die auf einer Wand immobilisierten Bindungsstellen, was bei einer ausreichenden Antikörperkonzentration zu einem Ablösen der Zellen führt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Zellkulturgefäßen bzw. Mikroskopieträgern kann man nun die Antikörper über die Dialysemembran so weit verdünnen, dass die Zellen wieder die Möglichkeit besitzen, an der Oberfläche zu adhären. Damit lässt sich beispielsweise die Reversibilität von Bindungen von Zellen untereinander anhand von Zell-Substrat-Wechselwirkungen studieren.

In einer weiteren Anwendung können Zellen in Suspensionskulturen untersucht werden. Zellen in Suspensionskultur werden im Allgemeinen durch Zentrifugieren, anschließende Abnahme des Überstandes und Re-Suspension von Inhaltsstoffen des Puffers bzw. der Nährlösung in gereinigter Form erhalten. Für eine wirksame Reinigung ist es häufig nötig, diese Arbeitsschritte mehrmals zu wiederholen.

Durch die Verwendung der gezeigten Vorrichtung ist es möglich, Zellen in Suspensionskultur mit bestimmten Stoffen in Verbindung zu bringen oder das Zellmedium von diesen zu befreien. Beispielsweise können Zellen in Suspensionskultur in dem Beobachtungskanal 2b mit Stoffen versorgt werden, die durch eine im Dialysekanal 2a wachsende Zellkultur produziert werden, wobei die beiden Zellkulturen nicht miteinander vermischt werden. Diese Technik kann beispielsweise verwendet werden, wenn schlecht wachsende Zellen die Stoffe von sog. Fütterzellen benötigen, um besser *in vitro* kultiviert werden zu können. Die Fütterzellen können durch die unabhängige Fluidansteuerung beider Teilkammern jederzeit entfernt und wieder hinzugefügt werden, um etwa Kreuzreaktionen mit dem eigentlichen Experiment zu vermindern.

In einer weiteren Anwendung kann die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung verwendet werden, um ein Modellsystem für Sepsis zu bilden. Dabei wird eine humane Zellkultur im Beobachtungskanal und eine Bakterienkultur im Dialysekanal 2a gezüchtet. Die humanen Zellen werden durch die Bakterien vergiftet. Mit der gezeigten Vorrichtung lässt sich untersuchen, mit welchen Medikamenten man bei bestimmter Bakterien-dichte die humanen Zellen am Leben erhalten kann.

Zusätzlich zu den genannten Anwendungen kann die Membran in einer solchen Vorrichtung für Migrationsstudien, insbesondere für Chemotaxis-Untersuchungen, verwendet werden. Bei der Chemotaxis bewegen sich Zellen in einem chemischen Konzentrationsgradienten. Dabei kann zwischen horizontaler Chemotaxis (parallel zur Membran) und vertikaler Chemotaxis (senkrecht zur Membran) unterschieden werden.

Bei der horizontalen Chemotaxis werden in eine Teilkammer Zellen eingebracht, die auf der Oberfläche der Membran adhären. In die andere Teilkammer wird eine Lösung mit einer bestimmten Chemikalie (beispielsweise C-AMP) eingefüllt. Durch die Poren der Membran diffundiert die Lösung aus der zweiten in die erste Teilkammer und bildet dort einen radialen Konzentrationsgradienten um die Pore. Die Reaktion der dort befindlichen Zellen auf den Konzentrationsgradienten kann dann untersucht werden. Für dieses Experiment weist die Membran vorzugsweise eine oder mehrere Poren mit vorbestimmtem Porendurchmesser und vorbestimmtem Lochabstand auf.

Für solche Chemotaxis-Untersuchungen kann eine Membran nur eine Pore bzw. ein Loch in der Größe von 1nm bis 30 µm aufweisen. In diesem Fall können auf einer Seite der Membran (z. B. unterhalb der Membran) Zellen in einem Haltemedium vorgesehen sein. Beispielsweise können Zellen in Agar oder Agarose eingebracht sein. Statt Agar oder Agarose können auch andere Haltemedien verwendet werden. Die Haltemedien dienen u.a zur Verbesserung der optischen Analyse der Zelldynamik. Auf der anderen Seite der Membran (bspw. oberhalb der Membran) können ebenfalls in ein Haltemedium eingebettete Moleküle (Chemotaxine) vorgesehen sein. Dadurch muss für die Untersuchung keine Mikropipette mit einer Druckkontrolle verwendet werden, da die Konzentration der Chemotaxine, je nach Volumen des Haltemediums konstant bleibt, wenn die Chemotaxine durch das Loch diffundieren. Durch Diffusion dieser Chemotaxine von der ersten Seite der Membran durch das Loch auf die zweite Seite der Membran entsteht ein räumlich und zeitlich definierter Konzentrationsgradient auf der zweiten Seite der Membran. Somit kann untersucht werden, wie und ob die auf der zweiten Seite eingebetten Zellen auf den Konzentrationsgradienten reagieren. Die Membran ist vorzugsweise luftdurchlässig.

In Figuren 2a und 2b ist ein mögliches Beispiel einer entsprechenden Vorrichtung dargestellt. Grundsätzlich ist für diese Untersuchung keine Verwendung einer Flusskammer nötig. In Figur 2a ist ein entsprechender Aufbau in Explosionsansicht gezeigt. Auf einer Grundplatte 15 ist ein mit einem Haltemedium für Zellen (z.B. Agarose) be-

5 netzter Bereich aufgebracht. In diesem Bereich befinden sich auch die zu untersuchenden Zellen. Eine Membran 17 mit nur einem Loch 18 trennt diesen Bereich von dem mit Chemotaxinen angereicherten Haltemedium 19. Figur 2b zeigt den zusammengesetzten Analyseträger.

- 10 Solche Haltemedien können allerdings auch in einer Vorrichtung gemäß der Erfindung vorgesehen sein. Dazu können die Haltemedien jeweils in den Teilkammern, die durch die Membran getrennt sind, vorgesehen sein. Beispielsweise kann die Membran die Ober- und Unterseite von zwei in einem Substrat angeordneten Kanälen darstellen, analog zu dem in Fig. 1 gezeigten Beispiel. Alternativ können auch mehrere,
- 15 typischerweise 2 – 96, durch Membranen mit einem Loch getrennte Reservoirs als Töpfchen auf einem Träger oder durch einen Kanal in einem Träger vorgesehen sein.

Bei der vertikalen Chemotaxis wird die Migration von Zellen in einem chemischen Konzentrationsgradienten durch eine Membran untersucht. In einer typischen Anwendung kann beispielsweise ein homogener Zellrasen (Zelltyp A) auf einer porösen

20 Membran gezüchtet werden. Durch die Erzeugung eines Konzentrationsgradienten (Befüllen der anderen Teilkammer mit einem Lösungsmittel) kann die Wanderung eines weiteren Zelltyps (Zelltyp B) durch den Zellrasen analysiert werden.

- 25 Die Konzentration des Zelltyps B in der zweiten Teilkammer kann beispielsweise durch Fluoreszenz-Techniken nachgewiesen werden. Weiterhin kann die Lösung im zweiten Kanal nach einer bestimmten Zeit entnommen und die Konzentration des Zelltyps B bestimmt werden. Untersuchungen von Leukozyten-Wanderungen durch verschiedene Zelllayer in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Sub-
- 30 stanzen und der Zelllayer können somit durchgeführt werden. In diesem Fall liegt der Porendurchmesser vorzugsweise bei 0,5 bis 20 μm .

In Figur 3 ist ein weiteres Beispiel einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen in Explosionsansicht gezeigt. Hier umfasst das Substrat eine Deckplatte 8 und eine Bo-

denfolie 9, die als Abdeckelement fungiert. In der Deckplatte 8 ist eine Ausnehmung 2a vorgesehen, welche die Kammer bildet.

5 In dem gezeigten Beispiel weist die Kammer nur zwei Zuführungen auf, wobei eine der Zuführungen in ein auf der Deckplatte angeordnetes Flüssigkeitsreservoir 7 mündet und die andere in die Auslassöffnung 13 mündet.

10 Weiterhin ist eine Membran 3 vorgesehen, die in dem Bereich 10a mit der Folie 9 und in dem Bereich 10b mit der Deckplatte 8 verklebt ist. Wie in der Figur zu sehen ist, wird die Membran 3 entlang ihres gesamten Randes mit der Deckplatte 8 verklebt, während die Membran an der dem Reservoir 7 zugewandten Seite nicht mit der Folie 9 verklebt ist. Dies bedeutet, dass eine durch das Reservoir 7 eintretende Flüssigkeit die Membran 3 passieren muss, bevor sie die Auslassöffnung 13 erreicht.

15 Solange keine Flüssigkeit über das Reservoir 7 in die Kammer gefüllt wird liegt die Membran zwischen den Klebebereichen flächig an der Folie 9 an.

20 Durch die Membran 3 wird die Kammer in zwei Teilkammern unterteilt, wobei die erste Teilkammer auf der Seite des Zuflusses und die zweite Teilkammer auf der Seite des Abflusses liegt. Die Membran ist mit der Deckplatte 8 derart verbunden, dass die gesamte Flüssigkeit, die durch das Flüssigkeitsreservoir 7 eingefüllt wird, durch die Membran strömen muss, um durch die Teilkammer 2a zum Auslass 13 zu gelangen. Durch das Befüllen über das Reservoir 7 wird die Membran von unten mit Druck beaufschlagt, löst sich von der Bodenfolie 9 und wird nach oben gedrückt. Vorzugsweise ist daher die Membran elastisch ausgebildet. Dies ist in Figur 3b in Seitenansicht und 25 in Figur 3c in dreidimensionaler Ansicht gezeigt.

In den gezeigten Figuren ist die zu untersuchende Lösung vor dem Filtern durch die Membran mit 12a und nach dem Filtern mit 12b bezeichnet.

30

Wenn sich beispielsweise in der Lösung Bakterien finden, welche die Membran 3 nicht passieren können, lagern sie sich in dem Bereich 14 der Membran an. Die gefilterte Lösung kann durch den Auslass 13 entweichen. Nach dem Durchspülen mit Flüssigkeit legt sich die Membran 3 wieder an die Bodenfolie 9 und kann von unten

mikroskopisch analysiert werden. Die Bakterien können beispielsweise mit FISH (Fluoreszenz-in-Situ Hybridisierung) angefärbt werden.

5 In Figur 4a – 4d ist eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen in einer Explosionsansicht gezeigt, und wie die Membran in die Vorrichtung eingebaut wird. Die Vorrichtung umfasst eine Abdeckplatte 21 und eine Grundfläche 25, beides in Form einer Kunststoffolie, sowie einen Ring 22 zur Erzeugung einer Nut, in der die Seitenränder der Membran 23 mit Hilfe von Positioniereinrichtungen 24 eingebaut wurden. Das Gitter 26 befindet sich zwischen der Membran und der Abdeckplatte. Ferner ist ein ringförmige Zuführung 27 dargestellt, die dem gleichmäßigen Befüllen der Kammer dient, sowie einen Zulauf 28 der zweiten Teilkammer und einen Ablauf 29 der ersten Teilkammer.

15 In Figuren 5a bis 5d ist eine Seitenansicht der Vorrichtung aus Figur 4 dargestellt.

Figur 5a zeigt die Seitenränder der Membran 23 in der durch den Ring 22 erzeugten Nut unter dem Gitter liegend. Der Ablauf 29 der ersten Teilkammer befindet sich oben, der Zulauf 28 der zweiten Teilkammer befindet sich unten in Form des ringförmigen Kanals 27.

20 In Figur 5b strömt aus dem Zulauf 28 ein Fluid in Pfeilrichtung gegen die Unterseite der Membran 23 und drückt diese gegen das Gitter 26. Die zu untersuchenden Partikel befinden sich in diesem Moment an der Unterseite der Membran, während der Rest des Fluids durch die Membran und das Gitter Richtung Ablauf 29 strömt.

25 Figur 5c stellt den Rückfluss dar, wie ein Fluid von dem Ablauf 29 aus durch das Gitter 26 auf die Membran 23 trifft. Die Membran beult sich durch den Druckstoß in Richtung Grundfläche 25 nach unten, liegt aber noch mit ihren Rändern in der Nut fest.

30 In Figur 5d liegt die Membran 23 aus Figur 5c durch den kurzen Rückfluss bereits vollständig an der Grundfläche 25 an, so dass nun das Rückflussfluid an den Membranrändern vorbei durch den Zulauf 28 abfließen kann.

Liegt, wie in Figur 5d beschrieben, die Membran 23 vollständig plan an der Grundfläche 25, kann die Membranunterseite mit den gefilterten Partikeln hochauflösend mikroskopiert werden, vorzugsweise mit einem Schärfentiefebereich von 0,5 – 200 µm.

- 5 Handelt es sich bei der zu analysierenden Flüssigkeit um Blut, Schlamm oder andere Proben, bei denen die Bakterien von anderen festen Bestandteilen getrennt werden müssen, kann die Oberfläche der Membran so modifiziert bzw. funktionalisiert sein, dass die Bakterien daran adhäreren. Vorzugsweise ist dann allerdings für die untere Teilkammer eine zusätzliche Auslassöffnung vorgesehen, die verschließbar ist. Durch
10 diese Auslassöffnung kann dann der untere Kanal gespült werden, um die genannten anderen festen Bestandteile zu entfernen.

- Vorzugsweise weist die Membran bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine große Fläche auf, um ein schnelles Durchspülen zu ermöglichen. In diesem Fall ist allerdings auch der zu mikroskopierende Bereich der Membran (Analysefläche) verhältnismäßig groß. Aus diesem Grund kann die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere die Beispiele in den Figuren, eine weitere Kammer aufweisen. Dabei werden dann die zu untersuchenden Teilchen, wie zuvor beschrieben, an der ersten Membran gefiltert und anschließend durch einen Rückspülvorgang, bei dem ein Fluss in entgegengesetzter Richtung angelegt wird, in einem weiteren Filter (Analysefilter) aufgefangen. Dieser hat vorzugsweise eine geringere Fläche und kann somit einfacher mikroskopisch betrachtet werden.
15
20

- Die weitere Kammer ist vorzugsweise über eine verschließbare Öffnung (beispielsweise mit einem Ventil) mit der entsprechenden Teilkammer verbunden, so dass erst nach Öffnen der verschließbaren Öffnung (zum Beispiel durch Beaufschlagen des Ventils mit einem vorbestimmten Druck durch den Rückspülvorgang), die Flüssigkeit, dann nur noch die tatsächlich zu untersuchenden Partikeln enthält, in die weitere Kammer gespült wird. Diese Bakterien werden dann an der zusätzlichen Analysemembran gefiltert und können dort mikroskopisch untersucht werden. Alternativ kann die Analysemembran in einen Deckel integriert sein, mit dem die Zuflussöffnung verschlossen werden kann.
25
30

Bei Ausführungsformen, die zwei Zuführungen für eine Teilkammer umfassen, wie beispielsweise in Figur 1 gezeigt ist, kann die Flüssigkeitszufuhr in eine Teilkammer durch die beiden Zuführungen gleichzeitig erfolgen. In diesem Fall sammeln sich die gefilterten Partikel hauptsächlich an dem Bereich der Membran, der in der Mitte zwischen den beiden Zuführungen liegt. An dieser Stelle kann dann eine Analyse der Partikel vorgenommen werden.

Für die verschiedene Anwendungen können die Oberflächen der Membran und/oder der Kammer funktionalisiert sein. Beispielsweise kann ein verbessertes Zellwachstum auf der Membran oder auf einer der Kammerinnenseiten bzw. -wände durch eine entsprechende Behandlung der Oberfläche erreicht werden. Insbesondere kann eine Beschichtung mit Polyelektrolytfilmen erfolgen, die typische Dicken im Bereich von 5 nm bis 100 nm haben. Die Beschichtungen können aus unterschiedlichen Polyelektrolytfilmen wie PAA, PEI und PSS bestehen. Insbesondere kann jeweils eine Basis- schicht aus einem dieser Materialien bestehen. Auf diese Schichten können direkt Biomoleküle wie Proteine oder DNA aufgebracht werden. Eine solche nicht-kovalente Bindung ist auch bei Anlegen eines Flusses im Kanal stabil.

Auch unspezifische oder spezifische Adhäsionsfaktoren für Moleküle oder Zellen (z.B. RGD-Peptide) können in dem Schichtaufbau, insbesondere in der zuletzt aufgebrachten Schicht, aufgebracht werden. Die zuletzt aufgebrachte Schicht kann funktionelle Gruppen wie COOH oder NH₂ enthalten. Diese können zum kovalenten Koppeln von Biomolekülen verwendet werden.

Nach dem Binden von Biomolekülen auf die oberste Polyelektrolytschicht kann eine weitere Schicht zum Blocken unspezifischer Bindungen aufgebracht werden. Dabei kann es sich um eine weitere Polyelektrolytschicht, eine Lipidmembran oder um ein Blockingmolekül wie BSA, Gelatine oder DNA handeln. Das aufgebrachte Biomolekül sollte dabei seine Bindungsfähigkeit erhalten.

30

Weiterhin können auch strukturierte Polyelektrolytschichten vorgesehen werden. Dies kann beispielsweise durch das Spotten von Polyelektrolytschichten erfolgen, was es dann ermöglicht, Biomoleküle oder Zellen an speziellen Bereichen der Kammer oder der Membran zu binden.

Zusätzlich können unterschiedliche Bereiche oder die verschiedenen Teilkammern mit unterschiedlichen Polyelektrolytschichten verwendet werden.

- 5 Ein Beschichten kann beispielsweise durch Lösen eines Polyelektrolyts in wässriger Lösung (ca. 0,1 mg/ml bis 10 mg/ml) bei neutralem pH erfolgen. Diese Lösung wird dann in die Kammer eingespült und dort über einen vorbestimmten Zeitraum (beispielsweise 10 Minuten bis 2 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise können zwischen einer und zwanzig Schichten aufgebracht werden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grund-
5 fläche und Deckfläche, wobei

in das Substrat eine Kammer zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei
Zuführungen integriert ist und

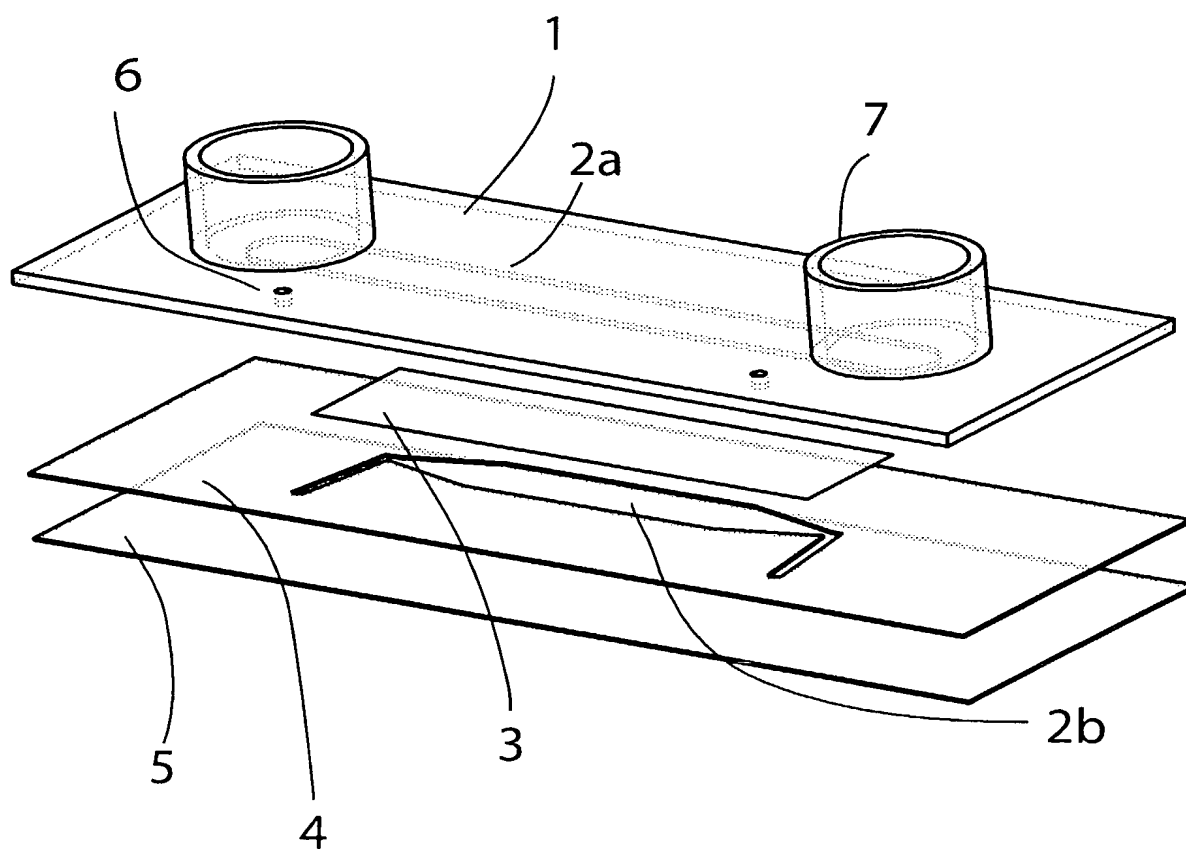
10 in der Kammer eine halbdurchlässige oder durchlässige Membran (3; 23) an-
geordnet ist, wobei die Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern (2a;
2b) mit jeweils wenigstens einer Zuführung unterteilt wird.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Teilkammern wenigstens teilweise
15 parallel zueinander angeordnet sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Teilkammern in einer Ebene
parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sind.
- 20 4. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran
wenigstens teilweise in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche
des Substrats angeordnet ist.
- 25 5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran
flexibel, vorzugsweise elastisch, ist.
6. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die erste
Teilkammer ein Gitter (26) umfasst.
- 30 7. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei die Membran so angeordnet ist, dass sie
bei einem Fluidstrom von der zweiten in die erste Teilkammer teilweise oder
vollständig an das Gitter gedrückt wird.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei die Membran fest zwischen erster und zweiter Teilkammer vorgesehen ist.
- 5 9. Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei die Membran lose zwischen erster und zweiter Teilkammer angeordnet ist.
- 10 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, wobei ein Mittel (22) vorgesehen ist, welches die Membran so positioniert, dass sie teilweise oder vollständig in dem Fluidstrom liegt.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6, 7, 9 oder 10, wobei die Membran so angeordnet ist, dass sie bei einem Fluidstrom von der ersten Teilkammer in die zweite Teilkammer teilweise oder vollständig gegen die Grundfläche gedrückt wird.
- 15 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 7, wobei die Membran wenigstens teilweise mit dem Boden der Kammer verbunden ist.
- 20 13. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Substrat zusätzlich Positioniereinrichtungen (24) für die Membran umfasst.
- 25 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 7, wobei wenigstens ein Teil der Membran an einem Teil der Kammerwand, insbesondere dem Boden der Kammer, flächig anliegend lösbar angeordnet ist.
- 30 15. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran wenigstens eine Pore aufweist, wobei jede Pore einen Porendurchmesser in einem vorbestimmten Teilbereich des Bereichs von 1 nm – 20 µm, vorzugsweise 0,5 µm – 20 µm, aufweist.
16. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Kammer wenigstens vier Zuführungen umfasst und durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens zwei Zuführungen unterteilt wird.

17. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei wenigstens eine Zuführung (28; 29) ringförmig um die Kammer verläuft.
- 5 18. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran und/oder eine Kammerwand eine Oberflächenfunktionalisierung aufweist.
- 10 19. Vorrichtung nach Anspruch 18, wobei die Oberflächenfunktionalisierung eine Beschichtung, insbesondere mit wenigstens einem Polyelektrolytfilm, einem Adhäsionsfaktor, einer funktionellen Gruppe, einem Biomolekül, einer Lipidmembran, einem Zellrasen und/oder einem Blockingmolekül, umfasst.
- 15 20. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Substrat einen Kunststoff, insbesondere einen optisch hochwertigen und/oder einen optisch nicht transparenten Kunststoff, umfasst.
- 20 21. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Substrat ein Deckenelement umfasst, in dessen Grundfläche eine Ausnehmung für die Kammer vorgesehen ist.
- 25 22. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei das Deckenelement eine Deckplatte (8) ist.
23. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei das Deckenelement eine Zwischenplatte (4), in welcher ein Durchbruch (2b) für die Kammer vorgesehen ist, und eine Abdeckplatte (1), welche zum Abdecken des Durchbruchs auf einer Seite der Zwischenplatte vorgesehen ist, umfasst.
- 30 24. Vorrichtung nach Anspruch 22 oder 23, wobei die Membran zwischen der Abdeckplatte und der Zwischenplatte angeordnet ist.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 – 24, wobei das Substrat ein Abdeckelement (5; 9) zum Abdecken der Ausnehmung umfasst.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, wobei das Abdeckelement eine Kunststoffolie, insbesondere aus einem optisch hochwertigen Kunststoff und/oder mit einer Dicke von 50 μm – 1 mm, ist.
- 5 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 – 26, wobei die Zuführungen in die Deckfläche des Deckenelements des Substrats münden.
28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei weiterhin wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir (7) vorgesehen ist, welches auf dem Deckenelement des Substrats angeordnet ist und in welches eine Zuführung mündet.
- 10 29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das wenigstens eine Flüssigkeitsreservoir aus einem Kunststoff, vorzugsweise dem selben Kunststoff wie das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung, ist.
- 15 30. Vorrichtung nach Anspruch 28 oder 29, wobei das Flüssigkeitsreservoir und das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung als ein Stück ausgebildet sind.
- 20 31. Vorrichtung nach Anspruch 30, wobei das eine Stück ein Spritzgussteil ist.
32. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, mit einer weiteren Kammer, welche mit einer der Teilkammern über eine verschließbare Öffnung verbunden ist, und mit einer weiteren Zuführung, wobei in der weiteren Kammer eine weitere Membran angeordnet ist, durch welche die weitere Kammer zwischen der verschließbaren Öffnung und der weiteren Zuführung in zwei Teilkammern unterteilt ist.
- 25 33. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Grund- und/oder Deckelfläche und/oder Membran aus einem optisch hochwertigen Material besteht, welches eine so geringe oder eine geringere Autofluoreszenz aufweist als COC oder COP.
- 30

Fig. 1



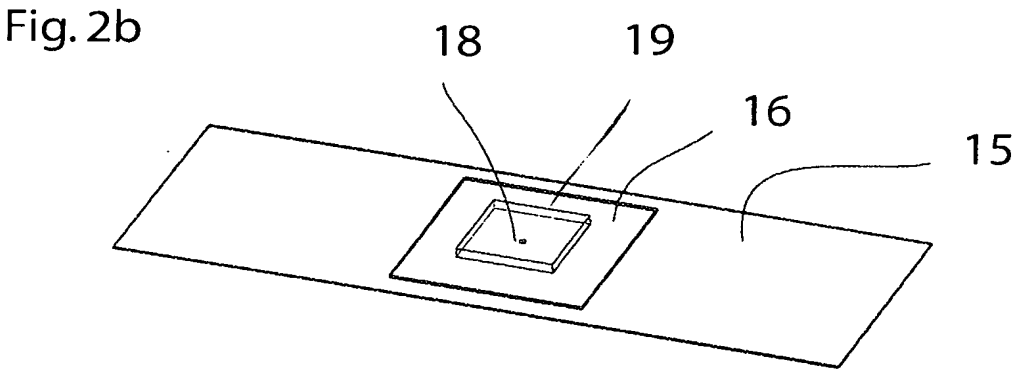
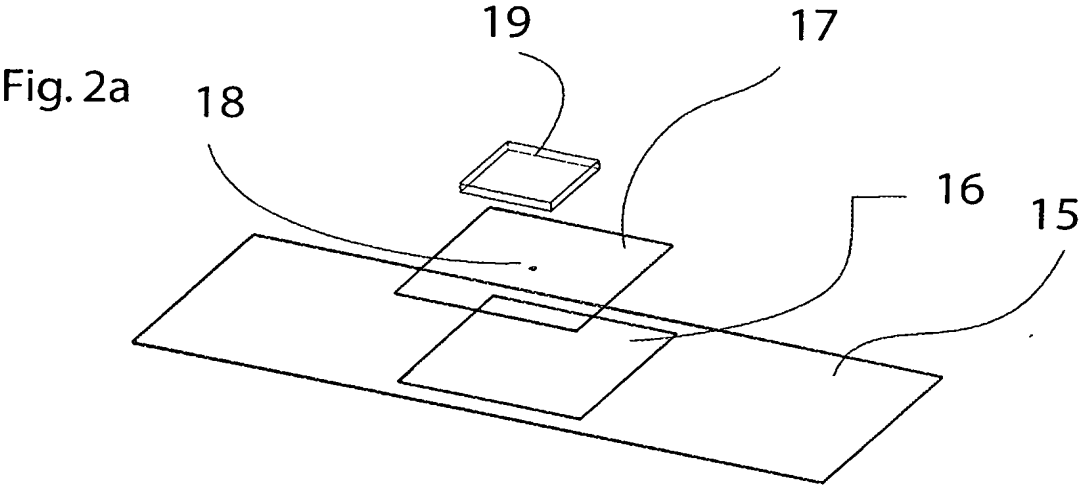


Fig. 3a

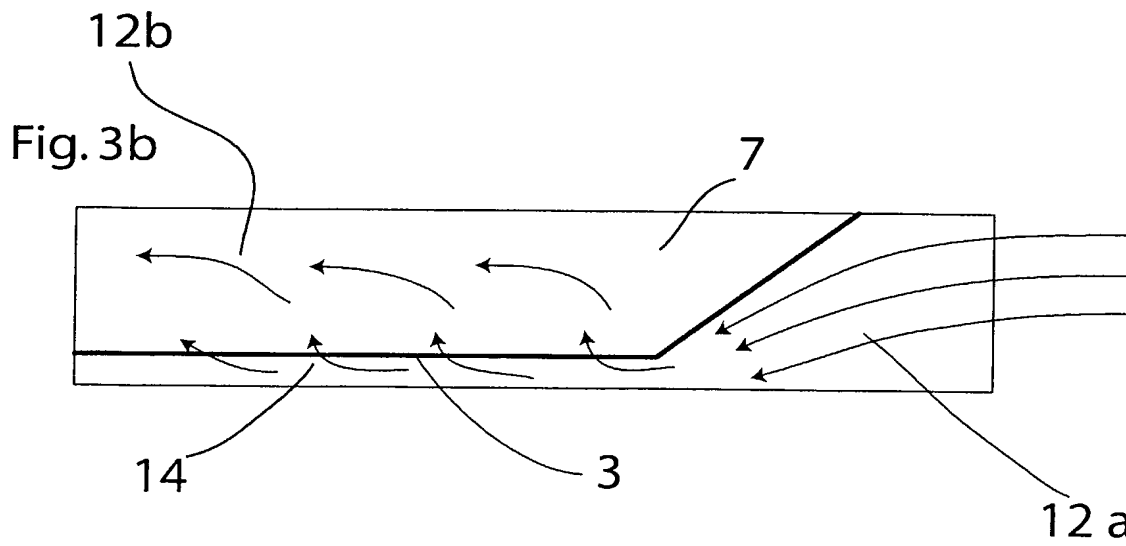
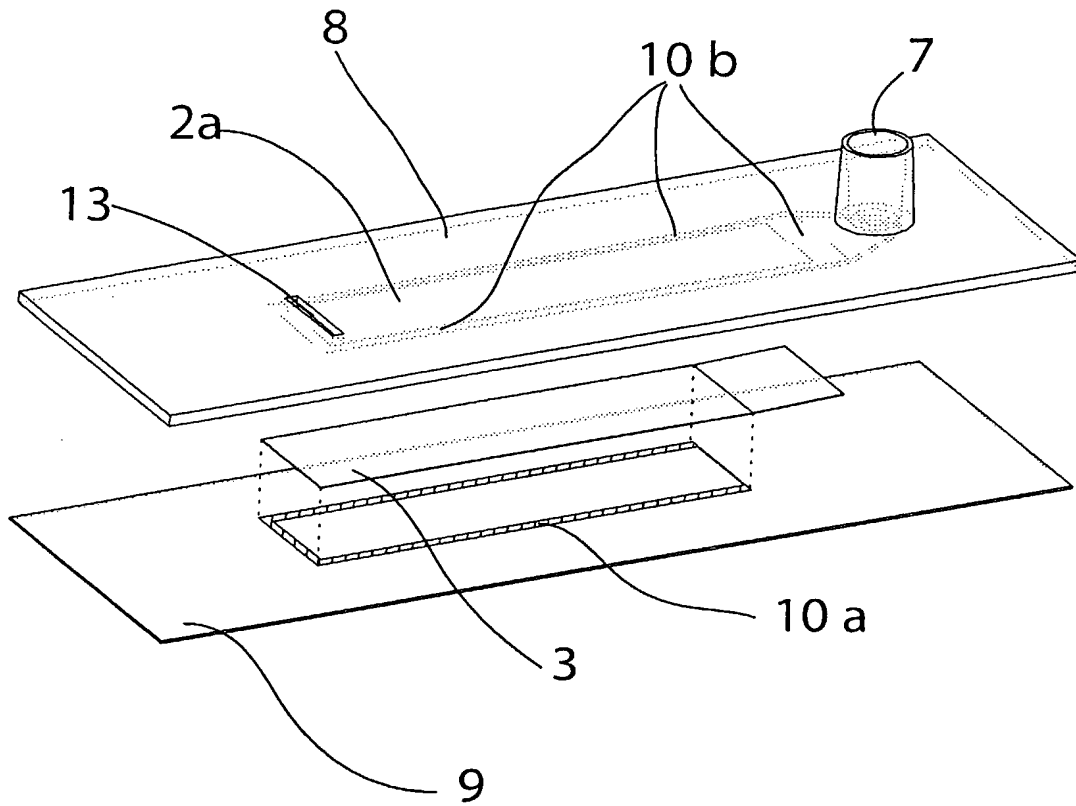


Fig. 3c

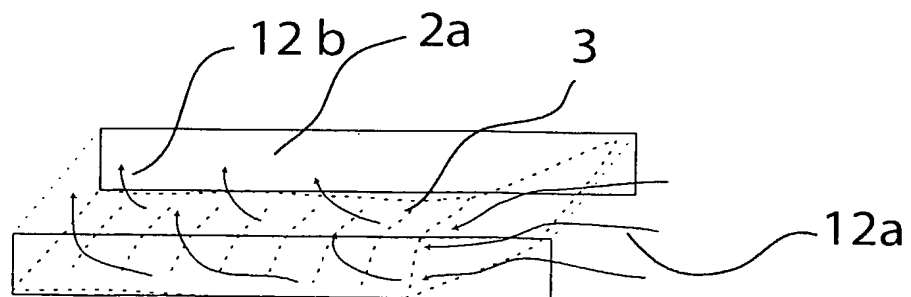


Fig. 4a

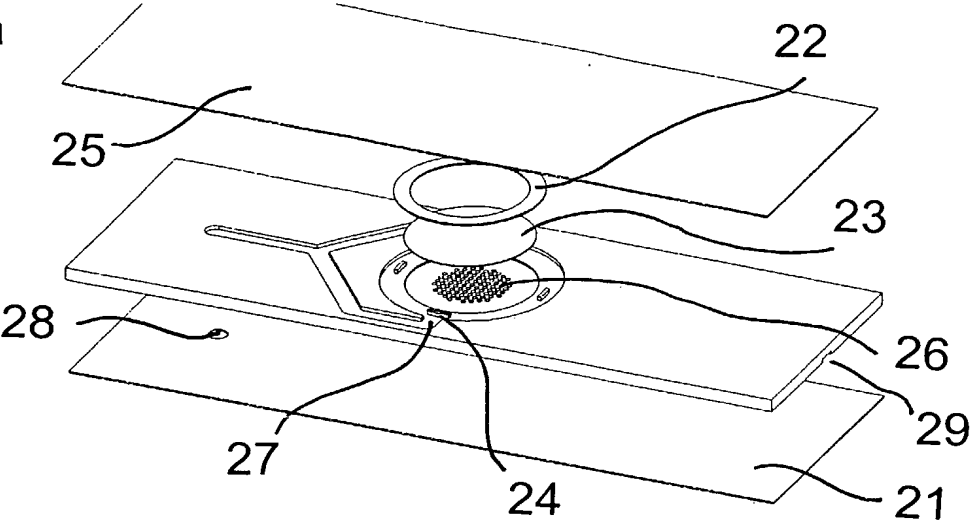


Fig. 4b

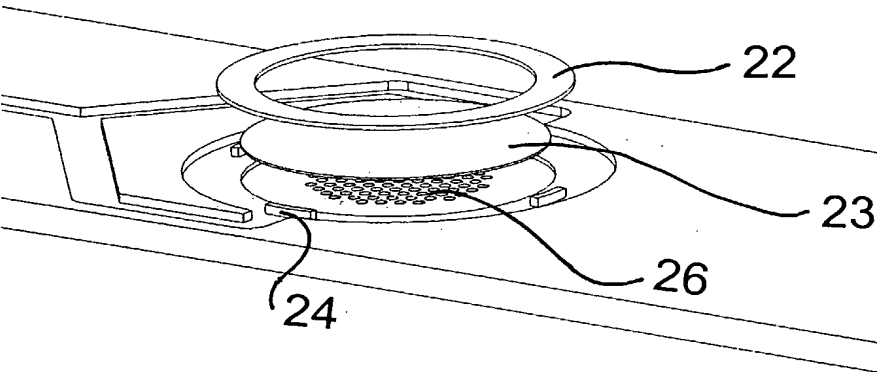


Fig. 4c

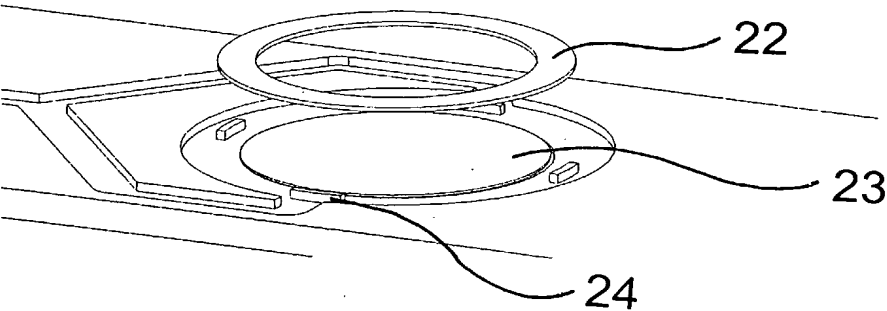


Fig. 4d

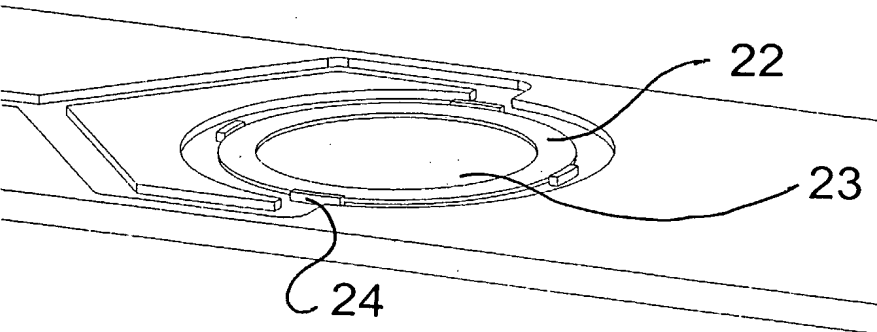
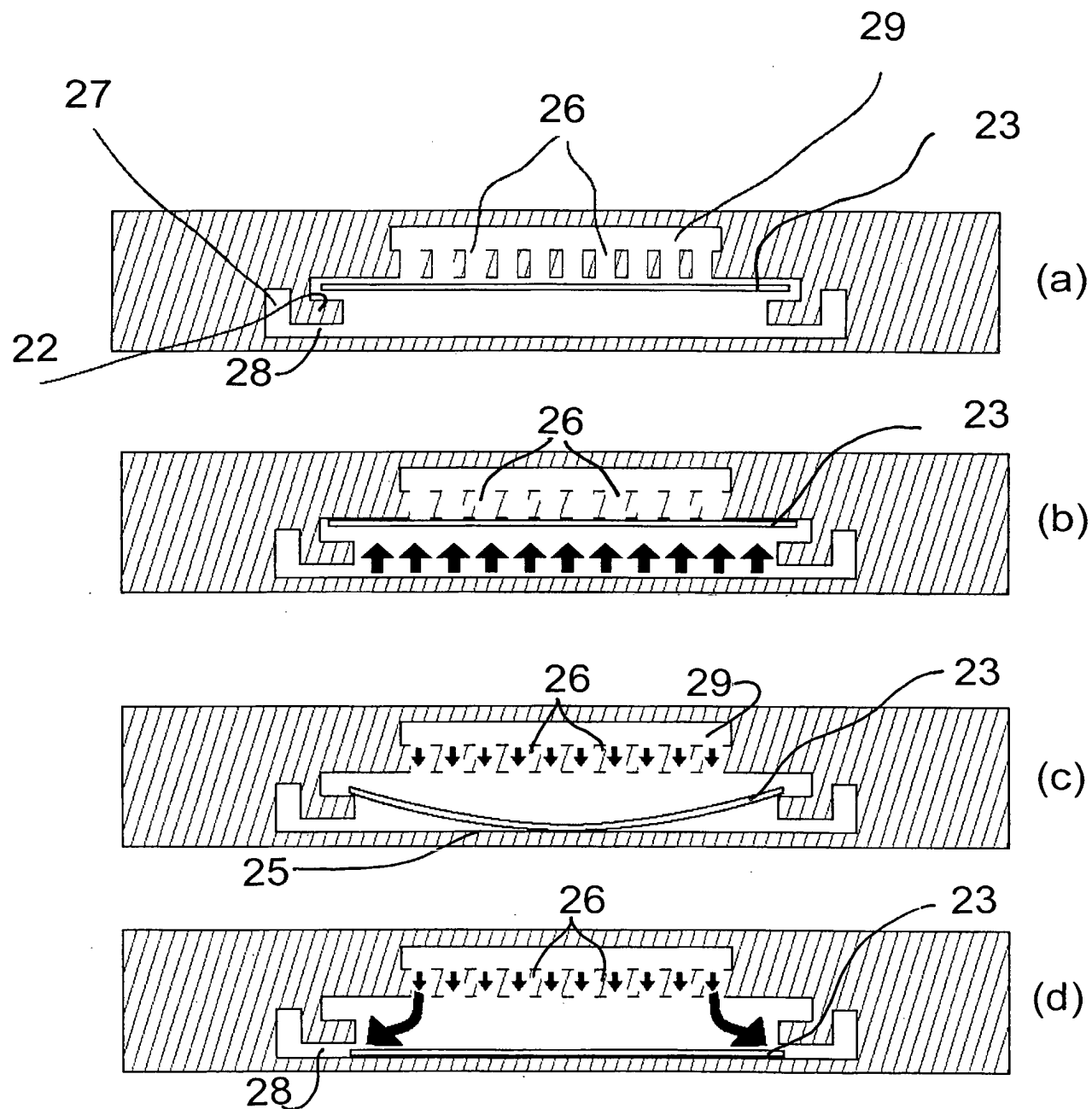


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01L3/00 C12M1/34 G02B21/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L C12M G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/06496 A (HAMPSHIRE ADVISORY TECH SERV ; MONRO PHILIP PETER (GB)) 19 February 1998 (1998-02-19) page 3, lines 5-25 page 7, line 15 - page 9, line 30 page 10, line 32 - page 12, line 16 page 13, line 27 - page 14, line 1 page 15, line 5 - page 23, line 15; figures 1-18	1-10, 13-16, 18-33
X	US 2003/198130 A1 (KARP CHRISTOPH D ET AL) 23 October 2003 (2003-10-23) paragraphs '0066! - '0070!; figures 8,9	1-5,15, 18,20-33
X	DE 44 43 902 C (MINUTH WILL PROF DR) 18 April 1996 (1996-04-18) columns 2-3; figure 2	1-4,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 April 2005

Date of mailing of the international search report

21 04 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tiede, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011052

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/041862 A (UNIV BATH ; MEDLAND ANTHONY JOHN (GB)) 22 May 2003 (2003-05-22) pages 19-34; figures 1-21 -----	1-5, 13, 15-33
A	DE 43 34 677 C (BIRKE ROLAND) 28 July 1994 (1994-07-28) cited in the application the whole document -----	1-4, 16
A	DE 101 48 210 A (IBIDI GMBH) 24 April 2003 (2003-04-24) paragraphs '0011! - '0022!, '0035! -----	1-4, 16
A	US 4 756 884 A (ALLEN JIM ET AL) 12 July 1988 (1988-07-12) columns 5-7 -----	1-4, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/011052

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-33
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box III

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-4, 16

Device for microfluidic analysis.

1.1. Claims 1-4

Details relating to the chamber arrangement.

1.2. Claim 16

Four feeds to the independent flow-through arrangement of the sub-chambers.

2. Claims 5, 15, 18, 19, 20, 33

Material properties of the membrane and/or substrate used in order to improve the optical or adhesive properties.

3. Claims 6-14

Positioning and holding of the membrane for the purpose of simplified microscoping.

4. Claim 17

Annular feed for even filling of the chamber.

5. Claims 21-31

Details relating to the cover structure for simplifying the manufacturing properties.

6. Claim 32

Additional chamber with an additional membrane integrated into a sub-chamber.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011052

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9806496	A	19-02-1998	WO 9806496 A1	19-02-1998
			AU 6707496 A	06-03-1998
			CA 2263130 A1	19-02-1998
			EP 0918563 A1	02-06-1999
			JP 2001502791 T	27-02-2001
			US 6506346 B1	14-01-2003
US 2003198130	A1	23-10-2003	AU 8107601 A	18-02-2002
			EP 1309404 A2	14-05-2003
			WO 0211888 A2	14-02-2002
			US 2002097633 A1	25-07-2002
			US 2002113009 A1	22-08-2002
DE 4443902	C	18-04-1996	DE 4443902 C1	18-04-1996
			JP 2847669 B2	20-01-1999
			JP 8336382 A	24-12-1996
			US 5665599 A	09-09-1997
WO 03041862	A	22-05-2003	EP 1446227 A1	18-08-2004
			WO 03041862 A1	22-05-2003
			US 2005019222 A1	27-01-2005
DE 4334677	C	28-07-1994	DE 4334677 C1	28-07-1994
DE 10148210	A	24-04-2003	DE 10148210 A1	24-04-2003
			WO 03029788 A2	10-04-2003
			EP 1458483 A2	22-09-2004
			JP 2005504317 T	10-02-2005
			US 2005019231 A1	27-01-2005
US 4756884	A	12-07-1988	AT 105084 T	15-05-1994
			AU 593001 B2	01-02-1990
			AU 6088486 A	12-02-1987
			CA 1275231 C	16-10-1990
			DE 3650530 D1	18-07-1996
			DE 3650530 T2	21-11-1996
			DE 3650574 D1	31-10-1996
			DE 3650574 T2	13-03-1997
			DE 3650610 D1	15-05-1997
			DE 3650610 T2	25-09-1997
			DE 3689812 D1	01-06-1994
			DE 3689812 T2	01-09-1994
			EP 0212314 A2	04-03-1987
			EP 0483117 A2	29-04-1992
			EP 0485368 A2	13-05-1992
			EP 0488994 A2	03-06-1992
			JP 7092169 A	07-04-1995
			JP 7104356 B	13-11-1995
			JP 1945801 C	23-06-1995
			JP 6058373 B	03-08-1994
			JP 62129759 A	12-06-1987
			JP 2032116 C	19-03-1996
			JP 6094722 A	08-04-1994
			JP 7069330 B	26-07-1995
			JP 2595422 B2	02-04-1997
			JP 6094723 A	08-04-1994
			JP 2075360 C	25-07-1996
			JP 6094724 A	08-04-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/011052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4756884	A	JP 7117546 B	18-12-1995
		US 5004923 A	02-04-1991
		US 5164598 A	17-11-1992
		US 5144139 A	01-09-1992
		US 5204525 A	20-04-1993
		US 5140161 A	18-08-1992
		US 5300779 A	05-04-1994
		US 4963498 A	16-10-1990
		US 4948961 A	14-08-1990
<hr/>			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 B01L3/00 C12M1/34 G02B21/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01L C12M G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98/06496 A (HAMPSHIRE ADVISORY TECH SERV ; MONRO PHILIP PETER (GB)) 19. Februar 1998 (1998-02-19) Seite 3, Zeilen 5-25 Seite 7, Zeile 15 - Seite 9, Zeile 30 Seite 10, Zeile 32 - Seite 12, Zeile 16 Seite 13, Zeile 27 - Seite 14, Zeile 1 Seite 15, Zeile 5 - Seite 23, Zeile 15; Abbildungen 1-18	1-10, 13-16, 18-33
X	US 2003/198130 A1 (KARP CHRISTOPH D ET AL) 23. Oktober 2003 (2003-10-23) Absätze '0066! - '0070!; Abbildungen 8,9	1-5, 15, 18, 20-33
X	DE 44 43 902 C (MINUTH WILL PROF DR) 18. April 1996 (1996-04-18) Spalten 2-3; Abbildung 2	1-4, 16
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. April 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21.04.2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tiede, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/041862 A (UNIV BATH ; MEDLAND ANTHONY JOHN (GB)) 22. Mai 2003 (2003-05-22) Seiten 19-34; Abbildungen 1-21 -----	1-5, 13, 15-33
A	DE 43 34 677 C (BIRKE ROLAND) 28. Juli 1994 (1994-07-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-4, 16
A	DE 101 48 210 A (IBIDI GMBH) 24. April 2003 (2003-04-24) Absätze '0011! - '0022!, '0035! -----	1-4, 16
A	US 4 756 884 A (ALLEN JIM ET AL) 12. Juli 1988 (1988-07-12) Spalten 5-7 -----	1-4, 16

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-33
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-4,16

Vorrichtung zur Mikrofluiduntersuchung

1.1. Ansprüche: 1-4

Details zur Kammeranordnung

1.2. Anspruch: 16

Vier Zuführungen zur unabhängigen Durchflussanordnung der Teilkammern

2. Ansprüche: 5,15,18,19,20,33

Materialeigenschaften der verwendeten Membran und/oder des Substrates zur Verbesserung der optischen oder adhäsiven Eigenschaften

3. Ansprüche: 6-14

Positionierung und Halterung der Membran zwecks vereinfachter Mikroskopierung

4. Anspruch: 17

Ringförmige Zuführung zur gleichmäßigen Befüllung der Kammer

5. Ansprüche: 21-31

Details zur Deckelkonstruktion zur Vereinfachung der Fertigungseigenschaften

6. Anspruch: 32

weitere Kammer mit einer weiteren Membran integriert in eine Teilkammer

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011052

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9806496 A	19-02-1998	WO 9806496 A1	19-02-1998
		AU 6707496 A	06-03-1998
		CA 2263130 A1	19-02-1998
		EP 0918563 A1	02-06-1999
		JP 2001502791 T	27-02-2001
		US 6506346 B1	14-01-2003
US 2003198130 A1	23-10-2003	AU 8107601 A	18-02-2002
		EP 1309404 A2	14-05-2003
		WO 0211888 A2	14-02-2002
		US 2002097633 A1	25-07-2002
		US 2002113009 A1	22-08-2002
DE 4443902 C	18-04-1996	DE 4443902 C1	18-04-1996
		JP 2847669 B2	20-01-1999
		JP 8336382 A	24-12-1996
		US 5665599 A	09-09-1997
WO 03041862 A	22-05-2003	EP 1446227 A1	18-08-2004
		WO 03041862 A1	22-05-2003
		US 2005019222 A1	27-01-2005
DE 4334677 C	28-07-1994	DE 4334677 C1	28-07-1994
DE 10148210 A	24-04-2003	DE 10148210 A1	24-04-2003
		WO 03029788 A2	10-04-2003
		EP 1458483 A2	22-09-2004
		JP 2005504317 T	10-02-2005
		US 2005019231 A1	27-01-2005
US 4756884 A	12-07-1988	AT 105084 T	15-05-1994
		AU 593001 B2	01-02-1990
		AU 6088486 A	12-02-1987
		CA 1275231 C	16-10-1990
		DE 3650530 D1	18-07-1996
		DE 3650530 T2	21-11-1996
		DE 3650574 D1	31-10-1996
		DE 3650574 T2	13-03-1997
		DE 3650610 D1	15-05-1997
		DE 3650610 T2	25-09-1997
		DE 3689812 D1	01-06-1994
		DE 3689812 T2	01-09-1994
		EP 0212314 A2	04-03-1987
		EP 0483117 A2	29-04-1992
		EP 0485368 A2	13-05-1992
		EP 0488994 A2	03-06-1992
		JP 7092169 A	07-04-1995
		JP 7104356 B	13-11-1995
		JP 1945801 C	23-06-1995
		JP 6058373 B	03-08-1994
		JP 62129759 A	12-06-1987
		JP 2032116 C	19-03-1996
		JP 6094722 A	08-04-1994
		JP 7069330 B	26-07-1995
		JP 2595422 B2	02-04-1997
		JP 6094723 A	08-04-1994
		JP 2075360 C	25-07-1996
		JP 6094724 A	08-04-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011052

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4756884 A		JP 7117546 B	18-12-1995
		US 5004923 A	02-04-1991
		US 5164598 A	17-11-1992
		US 5144139 A	01-09-1992
		US 5204525 A	20-04-1993
		US 5140161 A	18-08-1992
		US 5300779 A	05-04-1994
		US 4963498 A	16-10-1990
		US 4948961 A	14-08-1990
